VDS - FMDV

操作手冊

口蹄疫病毒检测试剂盒

編号: V01-02-1114

适用于在畜牧业和环境监测样品

包括 50 个扩增反应所需的试剂

以生物科技服务全球

微孔板检测技术

修訂 1

2005 年 6 月

香港基因晶片开发有限公司

目 录

1. NASBA 技术简介
2. 试剂盒组成
3. 其他所需物品
4. 试剂预备
5. 试验步骤
6. 数据收集、分析和解释
7. 临界值（*cut-off limit*）的确定
8. 技术指导
9. 参考文献
10. 技术支持
11. 担保和责任
12. 局限性

1. NASBA 技术简介

NASBA(基于核酸序列的扩增技术)是一项连续、等温、基于酶反应的核酸扩增技术(Compton, 1991; Romano et al., 1996)。 该技术使用三种酶（禽类成肌细胞增多症病毒反转录酶、RNA 酶 H、噬菌体 T7 RNA 聚合酶）和两种特别设计的寡核苷酸引物。上游引物 5’末端包含有噬菌体 T7 的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶的启动子序列，下游引物的 5’末端包含有和钌标电化学发光检测探针（ECL Probe） 互补的序列。在扩增步骤中，两个 5’端都整合进扩增序列中，从而高效率的既成为生产互补 RNA 序列的模板，又能特异性结合检测步骤中的 ECL 探针（图 1）。该技术特别适用于扩增单链 RNA，并且已经成功应用于在大量不同的 DNA 或 RNA 病毒、细菌、霉菌、寄生虫和细胞因子的检测工作。在最适宜的条件下，扩增倍数将达十亿之多。RNA 可从各种不同的来源中分离获得，包括全血、血浆、内拭物、粪便、笼内垃圾以及草垫。

基于 NASBA 的技术提供了一个系统，能快速的以基因组为基础的来检测口蹄疫病毒。这个系统相对于免疫学方法（ELISA、免疫沉淀法和免疫荧光法）或其它基因检测法（RT-PCR，DNA 测序）有更多的优势。由于反转录过程被直接整合到扩增反应中，因此 NASBA 最适合分析 RNA 样品。在标准的条件下，这项测试能在 4 小时左右结束。样品中肝磷脂、EDTA、柠檬酸盐、血红蛋白、白蛋白和脂质等的污染将不会对结果造成影响(Romano et al., 1996)。

NASBA 反应产物是单链 RNA，它允许用户可以选择其首选的杂交检测系统来提高该技术的灵敏度和特异性。通过 AMV 逆转录酶和 T7 RNA 聚合酶进行的扩增反应因为由于反应条件温和 且以及比 PCR 反应所需时间短的反应时间，因此转录更加忠实于模板，错配率很低（Sooknanen et al., 1994）。这可能对病毒分离的系统分类鉴定很重要。另外，ECL 检测系统高度的自动化操作减少了手工操作的错误，进一步提高了敏感性灵敏度和特异性。使用 ECL 阅读器无需凝胶电泳，使操作更加便利，而且操作人员只需要最低限度的培训。

为了提高检测系统的特异性，两个口蹄疫病毒序列特异性的引物和一个额外的捕获探针 （Capture Probe） 被用来确定被扩增 RNA 的存在。在微孔板 (Microplate) 检测技术中，一个液态的扩增反应被捕获探针固定连接在微孔板上（图 2）。加入一个检测探针并连接被固定的扩增子。加入一个检测分子并产生比色信号要通过标准 96 孔微孔板分光光度计在 405nm 波长下检测。

图 1. NASBA 技术扩增原理

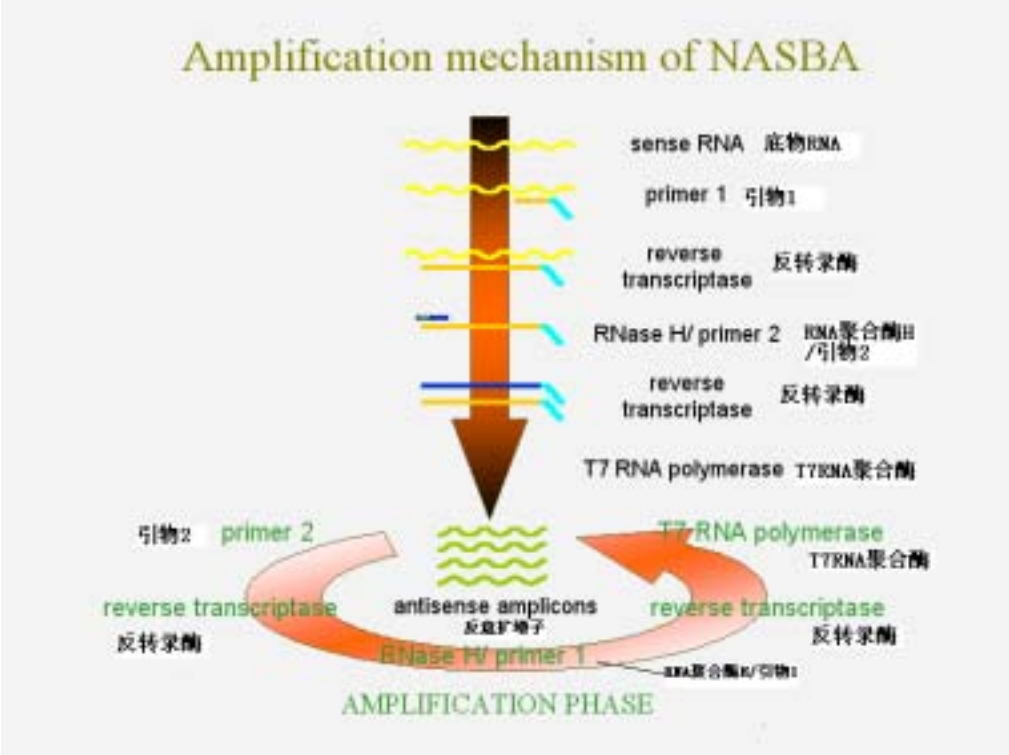
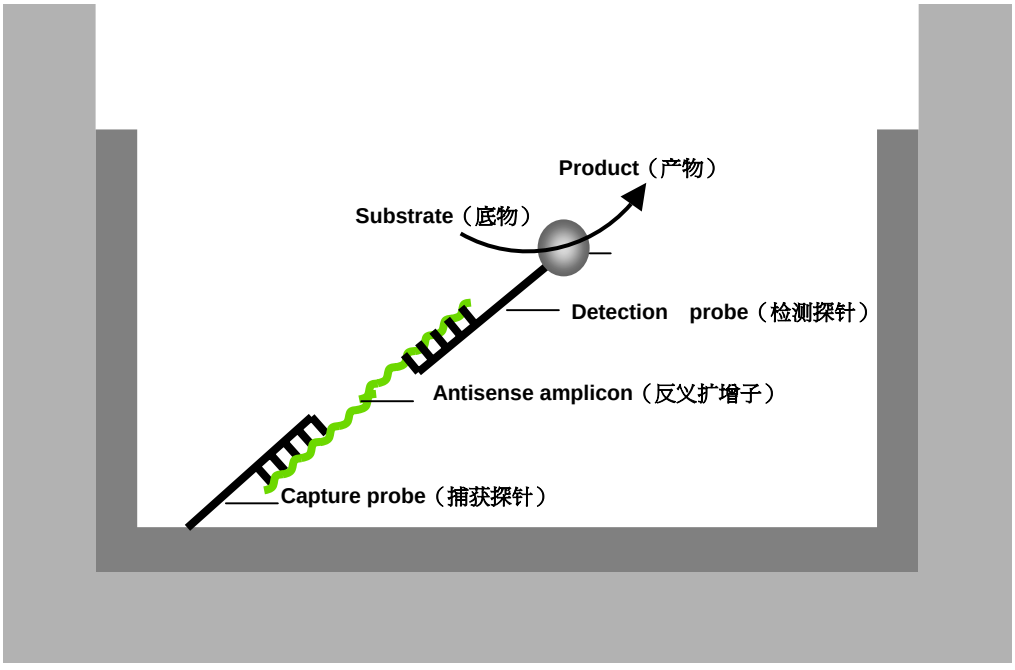


图 2. 微孔板检测系统



2. 试剂盒组成 (50 个反应)

开始前请通读此操作手册

储存条件

除了其中的一个小盒子储存在 4°C 外，其他所有试剂均应储存在 – 20°C。保质期标注在盒子上，在此日期后，所有试剂不可再使用。

核酸扩增

- 5 × 6.5 mg 酶球 (Enzymes Spheres; 红色盖子；含硅胶干燥剂)
- 1 × 0.5 ml 酶球稀释剂 (Enzyme Sphere Diluent; 红色盖子)
- 5 × 10 mg 試剂球 (Reagent Sphere; 兰色盖子；含硅胶干燥剂)
- 1 × 0.6 ml 試剂球稀释剂 (Reagent Sphere Diluent; 兰色盖子)
- 1 × 0.5 ml 氯化钾溶液 (KCl Stock Solution; 黄色盖子)
- 1 × 60 µl FMDV 引物混合物 (FMDV Primer Mixture)
- 1 × 25 µl FMDV 阳性对照 RNA (FMDV Positive Control)
- 2 × 1.5 ml NASBA 水 (NASBA Water; 白色盖子)

核酸检测组件

- 2 x 55 µl FMDV 探针溶液 (FMDV Probe Solution; 储存在 – 20°C)
- 5 x 1.1 ml 连接液 (Substrate Solution; 避光储存在 – 20°C)
- 1 x 10 ml 10 × TBS 清洗缓冲液 (10 × TBS Washing Buffer), pH 7.4 (储存在室温)
- 12 x 8 孔微孔板条和支持板框 (避光储存在室温)

小盒子 (储存在 4°C)

- 3 x 800 µl 杂交缓冲液 (Hybridisation Buffer)
- 5 x 1.1 ml 检测缓冲液 (Detection Solution)
- 1 x 11 µl 检测浓缩液 (Detection Concentrate)
- 5 x 1.1 ml 终止液 (Stop Solution)

3. 其他所需物品

下列物品为实验必需，但并不由试剂盒提供：

- 一次性手套
- 已校准的移液器 (量程 5 µl 到 200 µl)
- 一次性无 RNA 酶移液器枪头，我们推荐使用防气雾枪头以防止含有核酸的液体交叉污染样品。
- 无 RNA 酶的 1.5 ml 微量离心试管
- 微量离心试管架
- 旋涡振荡器
- 计时器
- 适合离心 1.5 ml 微量离心试管的台式离心机（转速能达到 10,000 x *g*）
- 已校准的温度计（精度 ±1°C）
- 加热器（可加热 1.5 ml 微量离心试管到 41°C ± 0.5°C 和 65°C ± 1.0°C）
- 水浴器（可加热 1.5 ml 微量离心试管和 5 ml 聚丙烯试管到 41°C ± 0.5°C）
- 96-孔微孔板紫外/可见光分光光度计 (能检测 405 nm 波长)
- 焦碳酸二乙酯 (DEPC，用于准备无 RNA 酶水)

4. 试剂预备

开始前请通读此操作手册

核酸扩增

- 已预备的酶球（Enzymes spheres）和試剂球 (Reagent Sphere) 若保存于 -70℃下，應在两周内使用。其它扩增试剂开口后若保存在 -20℃下可继续使用
- 使用前将所有试剂放至室温

扩增试剂的预备

- 試剂球 (Reagent Sphere) 中加入 80 µl 試剂球稀释剂 (Reagent Sphere diluent)，并迅速振荡均匀
- 稀释的試剂球中加入 16 µl KCl 溶液 (KCl Stock Solution) 和 14 µl NASBA 水（NASBA Water），并振荡均匀
- 加入 10 µl FMDV 引物混合物 (FMDV Primer Mixture)，振荡混匀合
- 不能离心
- 在 30 分钟内使用

酶溶液的预备

- 酶球（Enzymes spheres）中加入 55 µl 酶稀释液（Enzyme sphere diluent），将此溶液室温放置至少 20 分钟
- 用手指轻轻扣击试管让酶球充分溶解
- 不能剧烈振荡任何含酶的溶液
- 使用前温和离心试管
- 在一小时内使用

微孔板核酸检测

- 检测试剂开口后剩下的若保存在 2-8℃ 下可继续使用
- 使用前将所有试剂放至室温
- 离心所有微量离心管将液体甩到管子底部

4. 试剂预备 (续)

1. FMDV 探针溶液 (FMDV Probe solution)

- 解冻至室温，注意在使用前完全混匀

2. 杂交缓冲液 (Hybridisation Buffer)

- 使用前完全混匀

3. 检测缓冲液 (Detection Solution)

- 使用前完全混匀

4. 检测浓缩液 (Detection Concentrate)

- 按 1:500 在检测缓冲液中稀释，并在使用前完全混匀

5. 连接液 (Substrate Solution)

- 避光解冻至室温，注意在使用前完全混匀

6. 终止液 (Stop Solution)

- 无需处理即可使用

7. 10x TBS 清洗缓冲液 (10x TBS Washing Buffer)

- 以 0.1% DEPC 处理过的水按 1:10，稀释并在使用前完全混匀

注意: 反复冻融冰冻试剂可能降低试剂盒灵敏度。未解冻试剂可稳定存放 12 个月。

8. 微孔板条 (Microtitre Plate Strips)

- 拿出检测样品所需足够数量的微孔板板条。

9. 微孔板支持板框 (Microtitre Plate Support Frame)

- 无需处理即可使用

5. 试验步骤

备注：

- 实验过程中必须带手套以防止 RNA 样品接触 RNA 酶
- 如无特别规定，所有操作步骤均在室温下完成
- 不能剧烈振荡任何含酶的溶液

核酸扩增

1. 每個扩增反应须要吸取 5 μl 核酸提取物放入新的试管
2. 加入 10 μl 扩增试剂（见第 4 部分）
3. 在 65℃ 温育 5 分钟
4. 在 41℃ 冷却试管 5 分钟
5. 加入 5 μl 酶溶液（见第 4 部分），并用手指轻轻扣击试管促使混合均匀
6. 迅速放回试管并在 41℃ 温育 5 分钟
7. 将试管稍微离心后在 41℃ 温育 90 分钟
8. 立即检测产物，若在 -20℃ 保存扩增产物不得超过 1 个月

核酸检测

1. 在支持板框中安放足够检测所需的微孔板板条。
2. 加 2 l 探针溶液 (probe solution) ，5 l NASBA 产物和 43 l 杂交缓冲液 (hybridisation buffer) 至一个 0.5 ml 或 1.5 ml 的微量离心管中并完全混匀。
3. 每个 NASBA 产物重复上述步骤。
4. 将杂交混合物加入微孔板每个独立的孔中。避免在孔中引入泡沫。牢牢盖上塑料膜避免蒸发。
5. 在 41℃ 温育 1 小时。
6. 以 250 l 1 x TBS, pH 7.4 清洗小孔三次。每次倾去溶液后要拍干微孔板。
7. 每孔加 100 l 检测缓冲液 (detection solution)（必须确定已加进检测浓缩液 [detection concentrate] ，检测缓冲液配制方法请参看第 4 部分）。牢牢盖上塑料膜避免蒸发。
8. 在室温下温育 30 分钟。
9. 以 250 l 1 x TBS, pH 7.4 清洗小孔三次。每次倾去溶液后要拍干微孔板。
10. 每孔加 100 l 连接液 (substrate solution)（小心避免在孔中引入泡沫）。
11. 避光室温温育 5 分钟。
12. 加 100 l 终止液 (stop solution) 并轻轻摇动来终止显色反应。
13. 将微孔板和微孔板板框放入标准 96 孔微孔板分光光度计并读取 405nm 吸光度。使用 100 l 连接液加 100 l 终止液（没有杂交和检测试剂）作为背景参照。

6. 数据收集、分析和解释

微孔板放置及检测的详细指导方针参考你的分光光度计说明书。

表 1. 典型的光吸收读数

样品名	定性结果	信号 (Abs_{405} ± S.D)
阴性检验（所有试剂 / 水取代 RNA）	阴性	0.097 ± 0.026
阴性对照（非 FMDV RNA）	阴性	0.151 ± 0.037
阳性对照（FMDV RNA）	阳性	0.959 ± 0.053

7. 临界值 (cut-off limit) 的确定

计算能够充分区分真正阳性和阴性样品之间差别的最合适的临界值 (cut-off limit) 是一个相对简单的过程。以下提供一个计算临界值的参考方法：

1. 测试 10 个已知阴性的样品和 10 个已知“弱阳性”的样品 （例如，稀释已知为阳性的样品）。 NASBA 反应一般有强阳性电化学发光信号，并且几乎没有中频电化学发光信号。
2. 确定临界值（cut-off limit）能够正确区分上述检测的样品中的阴性和弱阳性。该临界值必须比已知最高的已知 阴性样品的 Abs_{405} 信号值高，并比最低的已知弱阳性样品的 Abs_{405} 信号值低。
3. 更多已知的阴性和弱阳性样品可以进一步验证临界值（cut-off limit）是否合适。
4. 选择的临界值（cut-off limit） 只对当前实验有效，新的试验或新的仪器都需要重新调整（例如，缓冲液的组分、提取方法、反应时间等等）。

建议临界值是阴性对照值加 10 S.D[例如 0.12 + (10 x 0.012) = 0.24]。

我们实验室通常阴性对照样品获得的 S.D 在 0.15 ± 0.3 的范围。因此，我们的临界值大约是 0.45。

注意: 如果你获得的临界值超出这个范围，我们建议验你重新评估你的微孔板系统或联系香港基因晶片开发有限公司寻求技术支持。

8. 技术指导

现象	可能原因	解决方法
电化学发光信号微弱	RNA 酶污染	基础试剂盒种所提供的试剂都是去 RNA 酶的，请确保其它溶液和装置（吸量管、枪头、试管等）同样未被 RNA 酶污染
	模板失效	**不要使用玻璃试管**。 RNA 样品保存： ● 长期在 – 70°C； ● 2-8°C 不超过 14 天； ● 25°C 不超过 48 小时。
	扩增效率低下	加入酶溶液时将试管逐个从加热器上取下，加入后立即放回加热器上。扩增反应温度维持在 41°C ± 0.5°C
	酶的失活性	**不可振荡酶溶液。**酶对于物理因素影响相当敏感，并且会在振荡混合时失活。 **不可在 42°C 及以上存放酶溶液。**这也会使酶失活。
	靶 RNA 与探针之间的杂交率低下	注意在 41°C 温育。先把探针溶液 (probe solution) 、NASBA 产物和杂交缓冲液 (hybridisation buffer) 完全混匀后 ，才加入微孔板。避免在孔中引入泡沫。
IRS 值低于 10,000	仪器未校准	联系你的梅里埃公司代理商

9. 参考文献

R. Boom, C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P.M. E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noordaa (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology.

J. Compton. Nucleic acid sequence-based amplification (1991). Nature, 350, 91-92

J.W. Romano, K.G. Williams, R.N. Shurtiff (1997). NASBA technology: isothermal RNA amplification in qualitative and quantitative diagnostics. Immunological investigations, 26 (1&2), 15-28

R. Sooknanen, M. Howes, L. Read, L.T. Malek (1994). Fidelity of nucleic acid amplification with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and T7 RNA polymerase. Biotechniques 17 (6), 1077-1080, 1083-1085.

10.技术支持

如果您对此试剂盒有任何技术查询，可在我们的工作时致电 + (852) 2111 2123：

周一至周五；上午 9：00 – 下午 5：30
周六； 上午 9：00 – 下午 1：00

其余时间可以留下录音信息（英语，粤语和普通话）。

您还可以通过传真或和 email 与我们的技术人员联系。

传真：+ (852) 2111 9762

电邮：technical@dnachip.com.hk

香港基因晶片开发有限公司
香港筲箕湾阿公岩村道 18 号恒通资源中心 8 楼

电话： (852) 2111 2123

传真： (852) 2111 9762

电邮： info@dnachip.com.hk

网址： http://www.dnachip.com.hk/

11. 担保和责任

香港基因晶片开发有限公司担保使用方遵循以下条款时本公司产品原料和工艺不存在任何质量问题：1.产品不在出货日期一年后或产品外包装上注明的有效期后使用；2.产品储存条件完全符合技术指导和（或）包装上的说明；3.产品使用依照使用说明进行。香港基因晶片开发有限公司发布的应用规程是指导产品购买者的唯一指定使用说明。每位产品购买者务必确保所获得的应用规程与其购买的个人产品配套。除此之外，香港基因晶片开发有限公司不做任何其它的明确或隐含的担保，如其它商业性或特殊用途。

前述担保的相关条款中香港基因晶片开发有限公司的唯一责任是：仅当购买者发现在履行担保条款的情况下产品存在原料或生产工艺上的质量问题，并且及时通知香港基因晶片开发有限公司后，公司将视情况而定，替换有缺陷的产品或者部分或全部退还货款。香港基因晶片开发有限公司不对购买者或产品使用对象的任何因产品缺陷导致的间接损失或引发的经济和财产损失负责。

12. 局限性

VDS-FMDV 检测试剂盒是专为研究工作而设计的。 它的寡核苷酸引物和捕获探针能够检 测口蹄疫病毒中的有限数目的样品。这些引物和捕获探针的寡核苷酸序列被乐观的认为能检测口蹄疫病毒及和其同源病毒，这些病毒已经被测序并提交了公共数据库。如果试剂盒中的引物和（或）捕获探针不能对分离出的特定口蹄疫病毒进行扩增或检测，就会得出假阴性结果。如果试剂盒中的引物和（或）捕获探针能对非口蹄疫病毒来源进行扩增或检测，就会得出假阳性结果。这些情况可能会同样会发生在同源病毒检测上。

制造商不承诺或试图让这个试剂盒能检测所有已知被分离或未来将被发现的口蹄疫病毒。